

References

1. WEIL-MALHERBE, H. and A. D. BONE, J. Clin. Path., London 10, 138 (1957). — 2. WEIL-MALHERBE, H., Methods in Medical Research, Vol. 9, 130. Yearbook Publishers, Chicago (1961). — 3. SMITH, E. R. B. and H. WEIL-MALHERBE, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 60, 212 (1962). — 4. WEIL-MALHERBE, H., Unpublished results. — 5. GOODALL, McC. and L. ROSEN, J. Clin. Invest. 42, 1578 (1963). — 6. v. EULER, U. S., I. FLODING and F. LISHAJKO, Acta Soc. med. Upsal. 64, 217 (1959). — 7. WEIL-MALHERBE, H. and A. D. BONE, Biochem. J. 51, 311 (1952). — 8. CROUT, J. R., Standard Methods clin. Chem. 3, 62 (1961). — 9. v. EULER, U. S. and I. FLODING, Acta physiol. Scand. 33, suppl. 118, 45 (1955). — 10. v. EULER, U. S. and F. LISHAJKO, Acta physiol. Scand. 45, 122 (1959); 51, 348 (1961). — 11. MERRILLS, R. J., Analyt. Biochem. (New York) 6, 272 (1963). — 12. PALMER, J. F., J. Pharmacy Pharmacol. 15, 777 (1963). — 13. HÄGGENDAHIL, J., Acta physiol. Scand. 59, 242 (1963). — 14. WEIL-MALHERBE, H. and A. D. BONE, Lancet 1, 974 (1953). — 15. CARLSSON, A. and B. WALDECK, Acta physiol. Scand. 44, 293 (1958). — 16. DRUJAN, B. D., T. L. SOURKES, D. S. LAYNE and G. F. MURPHY, Canad. J. Biochem. Physiol. 37, 1153 (1959). — 17. BISCHOFF, F. and A. TORRES, Clin. Chem. (New York) 8, 370 (1962). — 18. UUSPÄÄ, V. J., Ann. med. exper. biol. Fenniae 41, 194 (1963). — 19. MIYAKE, H., H. YOSHIDA and R. IMAIZUMI, Jap. J. Pharmacol. 12, 79 (1962). — 20. WEIL-MALHERBE, H., Federat. Proc. 23, 491 (1964). — 21. WADA, Y., Tohoku J. Exper. Med. 79, 389 (1963). — 22. WEIL-MALHERBE, H., Analyt. Biochem. (1964), in the press. — 23. SUNDERMAN, F. W., JR., P. D. CLEVELAND, N. G. LAW and F. W. SUNDERMAN, Amer. J. Clin. Path., 34, 293 (1960).

Dr. Hans Weil-Malherbe
National Institute of Mental Health
Saint Elizabeths Hospital
Washington 20, D. C.

Fällbarkeit und Löslichkeit der Bence-Jones Proteine in der Hitze

II. Mitteilung über Bence-Jones Proteine

Von

H. HAUSER, A. HOLASEK, I. PASCHER

Aus dem Institut für physiologische Chemie der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. A. Holasek)

(Der Schriftleitung zugegangen am 5. März 1964)

An Hand zweier Bence-Jones Proteine, welche sich bei der Elektrophorese, Säulenchromatographie auf DEAE- und CM-Zellulose, Gelfiltration und Untersuchungen in der Ultrazentrifuge als einheitlich erwiesen hatten, wurde die Abhängigkeit der Hitzeaggregation von pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke untersucht. Das bei 60° gefällte Bence-Jones Protein konnte nicht nur bei 100°, sondern auch bei längerem Stehen bei Zimmertemperatur wieder in Lösung gebracht werden, wobei Eiweißmoleküle von annähernd ursprünglicher Molekülgröße und unverändertem thermischem Verhalten gefunden wurden. Aus dem Harn des einen Patienten wurde neben der Hauptfraktion ein Protein isoliert, dessen Molekulargewicht mit $MG = 22\ 000$ nur halb so groß war wie das des kristallisierten Bence-Jones Protein. Diese Nebenfraktion zeigte in konz. Salzlösungen das für Bence-Jones Proteine charakteristische Verhalten bei Hitzeaggregation und Hitzelöslichkeit.

The dependence of heat coagulation on pH, temperature and ionic strength was studied for two Bence-Jones proteins, which are homogeneous in electrophoresis, column chromatography on DEAE- and CM-cellulose, gel filtration and ultracentrifugation. The Bence-Jones protein which precipitated at 60° was redissolved not only at 100°, but also very slowly at room temperature, whereby the dissolved protein has a similar molecular size to the original and its thermal properties were unchanged. The patient's urine yielded, in addition to the main fraction, a protein of molecular weight 22 000, i. e., only half that of the crystalline Bence-Jones protein. In conc. solutions of salts, this extra fraction shows the characteristic heat coagulation and heat solubility properties of Bence-Jones proteins.

Paraproteine, die im Harn ausgeschieden werden, bezeichnet man als *Bence-Jones Proteine* („BJP“). Es handelt sich um eine Gruppe von Eiweißkörpern, die folgende gemeinsame Eigenschaften haben:

1. Sie kommen im Harn Myelomkranker, allein oder im Gemisch mit anderen Serumproteinen, vor.
2. Sie zeigen eine eigenartige Fällbarkeit und Löslichkeit (1) beim Erhitzen der Lösung.

3. Neueste Untersuchungen haben gezeigt, daß sie mit gewissen Bruchstücken der γ -Globuline sehr nahe verwandt oder sogar identisch sind (2).

Bekanntlich lassen sich die BJP in der Nähe des isoelektrischen Punktes schon bei Temperaturen um 50° fällen. Das Fällungsmaximum ist bei 60° erreicht. Bei weiterem Erhitzen bis zum Sieden löst sich der Niederschlag mehr oder minder vollständig auf. Durch reduktive

Spaltung von Disulfidbrücken kann man aus den normalen γ -Globulinen Peptidketten erhalten, die ein Molekulargewicht von etwas über 20 000 haben und die sich beim Erhitzen in wässriger Lösung wie BJP verhalten. Diese Bruchstücke des γ -Globulins sind auch Träger der Antikörperfunktionen des Globulinmoleküls (2). Bevor die Frage aufgeworfen werden kann, ob zwischen den beiden Eigenschaften, nämlich der Präzipitinfunktion und dem eigenartigen thermischen Verhalten, ein Zusammenhang besteht, ist es notwendig, die *Hitzegefällbarkeit* und *-löslichkeit* genauer zu untersuchen.

Für diese Untersuchung standen mehrere reine BJP zur Verfügung (3). Die Experimente wurden in der Hauptsache mit einem einheitlichen, kristallisierten BJP-R durchgeführt. Dieses Protein wurde im Harn des Patienten in einer Menge von etwa 10–15 g pro Tag ausgeschieden und zeigte das typische Verhalten, nämlich Koagulation bei etwas über 50° und teilweises Auflösen des Niederschlages in der Nähe des Siedepunktes.

Der Nachweis von BJP im Harn gelingt nicht immer auf Grund einer einfachen Kochprobe bzw. des Erhitzens im Thermostat. Ganz abgesehen von der Störung, die eventuell beigemengte Serumproteine hervorrufen, muß der pH-Wert des Harnes zwischen 4,5 und 5 liegen, da außerhalb dieses Bereiches, wie noch gezeigt wird, eine Fällung ausbleiben kann. Andererseits kommt es sehr oft zu keiner vollständigen Auflösung des Niederschlages bei 100°. Es kann aber auch ein BJP dadurch vorgetäuscht werden, daß die koagulierten Serumeiweißkörper des Harnes im Schaume der aufwallenden Flüssigkeit verschwinden oder die ursprünglich feine Trübung sich zu groben Flocken zusammenballt. Es dürfte nur wenig bekannt sein, daß der durch Sulfosalicylsäure hervorgerufene Niederschlag von BJP in der Hitze vollständig löslich ist. Diese Eigenschaft weisen alle von uns untersuchten BJP auf. Andere Eiweißbruchstücke (Peptone), die das gleiche Verhalten mit Sulfosalicylsäure zeigen, geben jedoch keine Hitzegefällung. Der einzige sichere Nachweis von BJP gelingt durch die Papierelektrophorese des Harnes. Das BJP bildet dabei im Elektropherogramm ein scharfes Band im Bereich der γ - bzw. β -Globuline und kann so auch bei der Ausscheidung anderer Serumproteine erkannt werden. Der Harn muß selbstverständlich dialysiert und konzentriert werden. Der über Nacht gegen fließendes Leitungswasser dialysierte Harn wird in einem Rotationsverdampfer bei Temperaturen um 30° im Vakuum oder noch schonender durch Ultrafiltration je nach dem Eiweißgehalt auf ein Zehntel bis Hundertstel des ursprünglichen Volumens eingengt. Der gegen Leitungswasser dialysierte Harn kann auch ohne großen apparativen Aufwand konzentriert werden, indem man einen kalten Luftstrom (Fön) gegen den unteren Teil des Dialysierschlauches, in dem sich der dialysierte Harn befindet, richtet.

Die BJP wurden aus dem Harn mit Ammoniumsulfat gefällt, abfiltriert und durch ausgiebige Dialyse gegen

destilliertes Wasser zur Kristallisation gebracht. Die Reinigung erfolgte durch 4–5malige Umkristallisation, wobei der Kristallbrei jeweils in Kochsalzlösung aufgelöst und gegen destilliertes Wasser wieder dialysiert wurde. In der Mutterlauge der ersten Kristallisation des hier beschriebenen BJP-R reichert sich ein Eiweißkörper an, welcher durch die Elektrophorese bei pH = 8,6 nicht nachweisbar ist. Wird jedoch die Elektrophorese bei pH = 4,6 durchgeführt, so tritt dieses Protein als scharf abgetrennte Nebenfraktion auf. Diese Nebenfraktion kann durch Gelfiltration auf „Sephadex G 75“ von der Hauptfraktion abgetrennt werden. Das Protein der Nebenfraktion läßt sich nicht kristallisieren, muß jedoch auf Grund der Untersuchungen in der Ultrazentrifuge, der Elektrophorese, der Gelfiltration und der Chromatographie auf DEAE-Zellulose als einheitlich bezeichnet werden.

Die Einheitlichkeit des kristallisierten BJP-R konnte nicht nur elektrophoretisch bei verschiedenen pH-Werten bewiesen werden; sie ergab sich auch in der Ultrazentrifuge (Untersuchung der Diffusion während des Sedimentationsversuches), chromatographisch (DEAE- und CM-Zellulose) und bei der Gelfiltration auf „Sephadex G 75“. Auf Grund der Sedimentations- und Diffusionskonstante errechnet sich ein Molekulargewicht von 45 000 (extrapoliert auf die Konzentration 0). — Die Nebenfraktion hat ein Molekulargewicht von 22 000. Dieses Gewicht entspricht auch dem Molekulargewicht der erwähnten Peptidkette des γ -Globulins und stellt etwa das halbe Molekulargewicht des kristallisierten BJP dar. Viele BJP lassen sich durch Harnstoff in Monomere mit einem Molekulargewicht mit etwas über 20 000 zerlegen, kommen jedoch im Harn meist als Dimere vor. Warum die hier beschriebene Nebenfraktion keine Dimerisation zeigt, ist nicht bekannt.

Hitze-koagulation des BJP

Wie bei allen Eiweißkörpern hängt die ausgefällte Menge des BJP von der Temperatur, dem pH-Wert und der Salzkonzentration der Lösung ab. Die BJP zeigen im isoelektrischen Punkt die stärkste Koagulation bei 60°. Die Lösung des hier beschriebenen BJP trübt sich im isoelektrischen Punkt schon bei 52° nach etwa 5 Minuten.

Erhitzt man die Lösung außerhalb des isoelektrischen Punktes, so findet man bezüglich der Fällbarkeit der verschiedenen BJP Unterschiede, die zu einer Einteilung dieser Eiweißkörper in zwei Gruppen geführt haben (4). Die eine Gruppe erfaßt BJP, deren Fällbarkeit nach den beiden Seiten des isoelektrischen Punktes relativ gleichmäßig abnimmt (β -Typus). Die BJP der zweiten Gruppe zeigen auf der basischen Seite des isoelektrischen Punktes zunächst keinen oder nur einen schwachen Abfall, bilden also ein Plateau über einige pH-Einheiten (α -Typus). Das hier beschriebene BJP-R gehört dem β -Typ an, vorausgesetzt, daß die Temperatur nicht über 60° steigt. Bei Temperaturen über 60° nimmt die Fällbarkeit des BJP vom β -Typ im isoelektrischen Punkt ab, auf der alkalischen Seite vom isoelektrischen Punkt nimmt sie

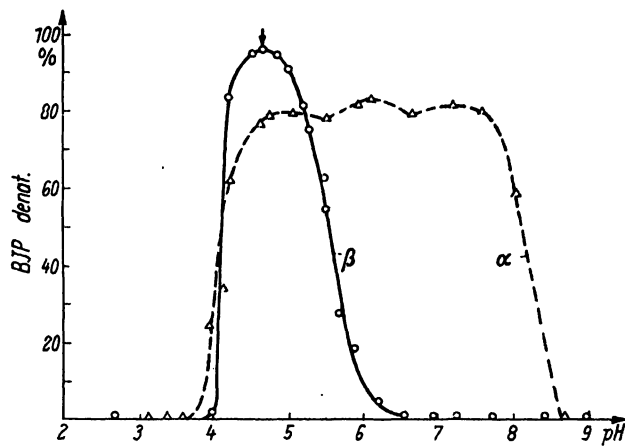


Abb. 1

Die bei 60° ausgefällte Proteinmenge, angegeben in %, in Abhängigkeit vom pH-Wert; Ionenstärke $\mu = 0,1$. — BJP-R (β -Typ); - - - - BJP-T (α -Typ)

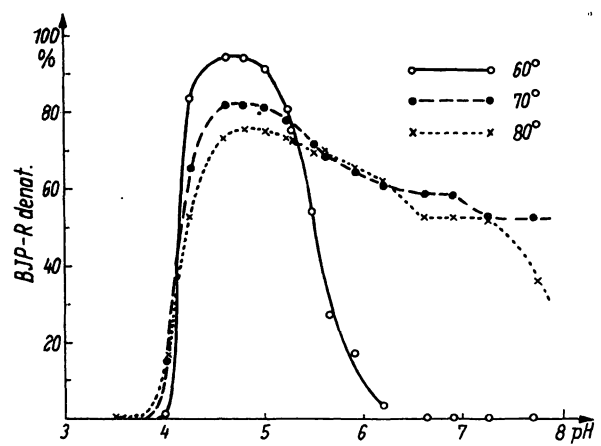


Abb. 2

Die gefällte Menge des BJP-R, angegeben in %, in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Temperatur; Ionenstärke $\mu = 0,1$. — bei 60°; - - - - bei 70°; bei 80°

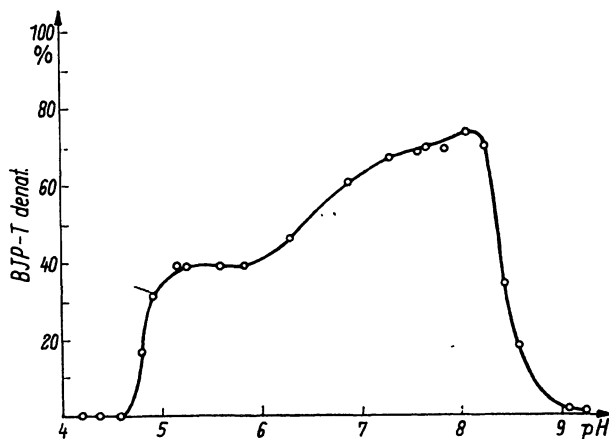


Abb. 3

Die gefällte Menge des BJP-T, angegeben in %, bei 54° in Abhängigkeit vom pH-Wert; Ionenstärke $\mu = 0,1$

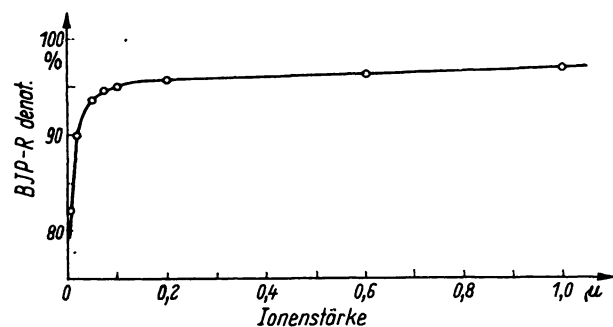


Abb. 4

Die im isoelektrischen Punkt gefällte Menge an BJP-R, angegeben in %, in Abhängigkeit von der Ionenstärke

jedoch zu. Der Verlauf der pH-Koagulationskurve ist daher bei 70° oder 80° sehr ähnlich dem des α -Typs bei 60°. Da der Kurvenverlauf demnach temperaturabhängig ist, sollte überprüft werden, ob die Einteilung in α - und β -Typus nur auf kleinen Unterschieden in der Temperaturempfindlichkeit beruht oder ob es sich um grobe Unterschiede im Aufbau des Moleküls handelt. Wenn ein BJP des β -Typus bei höheren Temperaturen Eigenschaften aufweist, wie sie dem α -Typus bei 60° zukommen, besteht die Möglichkeit, daß ein BJP des α -Typs bei einer Temperatur von etwa 55° eine Kurve ergibt, wie sie für den β -Typus bei 60° charakteristisch ist. Die Untersuchung eines BJP vom α -Typ (T) zeigt, daß nach 5 Minuten bei 51° im isoelektrischen Punkt die erste Trübung auftritt, bei 54° jedoch die pH-Koagulationskurve schon einen Verlauf hat, welcher zwar nicht identisch, aber ähnlich dem des α -Typs bei 60° ist. Das Ergebnis dieser Versuche deutet prinzipielle Unterschiede in der Tertiärstruktur an.

Die Salzkonzentration hat auf die Koagulation bei 60° insofern einen Einfluß, als bei einer Ionenstärke unter

0,04 die koagulierte Menge sehr stark abnimmt. Die niedermolekulare Nebenfraktion zeigt auch bei einer Ionenstärke von 0,1 keine Koagulation. Eine Fällung tritt erst dann auf, wenn die Kochsalzkonzentration außerordentlich stark erhöht wird. Unter diesen Bedingungen entsteht bei 60° ein Niederschlag, der sich in der Nähe des Siedepunktes vollständig auflöst und beim Abkühlen wieder ausfällt. Demnach zeigt die Nebenfraktion nur bei hoher Salzkonzentration das charakteristische Verhalten eines BJP.

Die Hitzelöslichkeit des BJP

Während sich die Nebenfraktion in der Siedehitze vollständig auflöst, zeigt das kristallisierte BJP-R nur eine partielle Löslichkeit. Untersucht man das Verhalten bei 100° (15 Minuten) in Abhängigkeit vom pH-Wert, so findet man die größte Löslichkeit zwischen pH = 4—4,5. Das Minimum der Löslichkeit liegt nicht im isoelektrischen Punkt (pH = 4,6) sondern bei pH = 5,2. Interessant ist die Beobachtung, daß sich das im isoelektrischen Punkt gefällte BJP-R nach 1—2 Tagen voll-

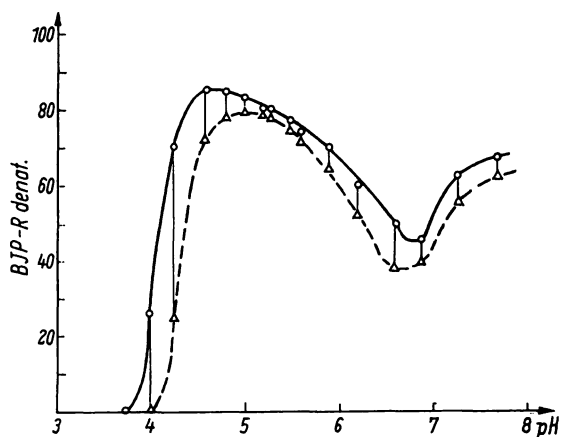


Abb. 5

Die koagulierte Menge des BJP-R, angegeben in %, nach Erhitzen auf 100° durch 15 Minuten in Abhängigkeit vom pH-Wert. Der Raum zwischen den Kurven entspricht der Proteinmenge, die in der Siedehitze löslich ist. — kaltfiltriert; - - - - heißfiltriert

ständig auflöst, wenn es bei Zimmertemperatur aufbewahrt wird. Bedeutend rascher jedoch löst sich das bei 60° im isoelektrischen Punkt gefällte BJP, wenn man den Niederschlag bei Zimmertemperatur gegen einen Puffer von pH = 6,5 dialysiert. Die so gewonnene klare Lösung kann ohne Bildung eines nennenswerten Niederschlages durch Dialyse wieder auf den isoelektrischen Punkt gebracht werden. Dieses gefällte und durch Dialyse oder Aufbewahrung bei Zimmertemperatur wieder in Lösung gebrachte BJP wurde im Sedimentationsversuch, elektrophoretisch, chromatographisch und auf „Sephadex“ untersucht und erwies sich bei diesen Untersuchungsmethoden als einheitlich. Es zeigte gegenüber dem nativen BJP nur bei der Sedimentation und Diffusion einen geringfügigen Unterschied, der noch näher untersucht werden müßte: Die Sedimentationskonstante liegt um 4% höher und die

Diffusionskonstante um 3,3% tiefer als bei dem nicht-denaturierten BJP.

Auch das thermische Verhalten des nach der Koagulation wieder aufgelösten BJP entspricht innerhalb der Fehlergrenzen vollkommen dem Verhalten des nativen BJP: Es beginnt schon bei 52° auszufallen, hat im isoelektrischen Punkt das Fällungsmaximum bei 60°, zeigt eine pH-Abhängigkeit der Fällung und der Hitzelöslichkeit wie das native BJP. — Das thermische Verhalten sowie die allmähliche Auflösung des Niederschlages bei Zimmertemperatur könnte man am einfachsten in folgender Art erklären: Ein Teil der Bindungen, welche die Tertiärstruktur des BJP fixieren, ist relativ schwach. Es kommt demnach schon bei 52° zu einer Lösung dieser Bindungen, wobei neue Bindungen zwischen einzelnen Molekülen zustande kommen und das Protein koagulierte. Diese Bindungen sind jedoch ebenfalls schwach, so daß sie bei höheren Temperaturen gelöst werden. Läßt man den bei 60° erzeugten Niederschlag bei Zimmertemperatur stehen, so kommt es ebenso wie bei höheren Temperaturen zu einer zwar langsameren, aber merklichen Lösung der Bindungen zwischen einzelnen Molekülen. Daß die auf diese Art freigewordenen Bindungen nun wieder das Protein in seinen anscheinend „nativen“ Zustand überführen und stabilisieren, läßt auf eine die ursprüngliche Tertiärstruktur begünstigende Anordnung der bindenden Gruppen innerhalb der Peptidkette schließen. — Bei Temperaturen über 60° kommt es zur Auflösung weiterer Bindungen in der Tertiärstruktur des BJP vom β -Typ, was einerseits die Zunahme der Menge hitzeprecipitierten BJP, andererseits die geringe Hitzelöslichkeit auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes erklären würde. Die Denaturierung schreitet fort. Beim BJP des α -Typs werden anscheinend schon bei niederen Temperaturen jene Bindungen in der Tertiärstruktur gelöst, die beim β -Typ erst über 60° aufgehoben werden.

Literatur

1. JONES, H. BENICE, *Lancet* 2, ii 88 (1947). — 2. EDELMAN, G. M. und J. A. GRALLY, *J. Exper. Med.* 116, 207 (1962). — 3. HOLASEK, A., I. PASCHER und H. HAUSER, *Mh. Chem.* 92, 463 (1961). — 4. PUTNAM, F. W., C. M. EASLY, L. T. LYNN, A. E. RITCHIE und R. A. PHLEPS, *Arch. Biochem. Biophysics* 83, 115 (1959).

Professor Dr. Anton Holasek
Institut für physiologische Chemie
der Universität Graz
Graz, Österreich
Universitätsplatz 2